

## 二色桌片参的化学成分研究

IV 二色桌片参糖蛋白的分离性质与抗肿瘤活性的研究<sup>△</sup>

吴萍茹 陈粤\* 方金瑞 苏文金\*\*

(福建省海洋研究所, 厦门 361012)

**摘 要** 二色桌片参 [*Mensamaria intercedens* (Lampert)] 的体壁经水煮提、分离、最后经 Sephadex G-200 柱层析纯化得二色桌片参糖蛋白 I (GPM I<sup>H</sup>)。GPM I<sup>H</sup> 经酶解后得二色桌片参糖蛋白 II (GPM I<sup>II</sup>)。分别研究了 GPM I<sup>H</sup> 和 GPM I<sup>II</sup> 的性状、化学组成和抗肿瘤活性, 结果表明: GPM I<sup>H</sup> 和 GPM I<sup>II</sup> 都是糖蛋白, 但蛋白组成和糖含量明显不同。GPM I<sup>II</sup> 对小鼠 S<sub>180</sub> 肉瘤有明显抑制作用, 而无直接毒性, 抑瘤率为 48.8%。而 GPM I<sup>H</sup> 却能显著提高 S<sub>180</sub> 肉瘤荷瘤小鼠的脾指数, 呈免疫增强作用。

**关键词** 糖蛋白, 二色桌片参, 化学性状, 抗肿瘤活性

STUDIES ON THE CHEMICAL CONSTITUENTS FROM SEA CUCUMBER *MENSAMARIA INTERCEDENS*IV . ISOLATION, PROPRETIES AND ANTITUMOR ACTIVITY OF THE GLYCOPROTEIN FROM *MENSAMARIA INTE RCEDENS*

Wu Pingru, Chen Yue, Fang Jinrui, Su Wenjin

(Fujian Institute of Oceanology, Xiamen 361012)

**ABSTRACT** Glycoprotein of *Mensamaria intercedens* (GPM I<sup>H</sup>) was extracted from the body of *Mensamaria intercedens* with hot water, and purification was finished with column chromatography on Sephadex G-200. GPM I<sup>H</sup> was hydrolyzed with enzymes to obtain glycoprotein of *Mensamaria intercedens* II (GPM I<sup>II</sup>). The chemical property, composition and antitumor activity of GPM I<sup>H</sup> and GPM I<sup>II</sup> were studied. The results showed that GPM I<sup>H</sup> and GPM I<sup>II</sup> were two kinds of glycoproteins in which the content of protein and sugar were different. GPM I<sup>II</sup> could significantly inhibit the growth of Sarcoma-180 cells implanted subcutaneously in mice ( $P < 0.05$ ) at the dose of  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  per day  $\times 10$  with no sign of toxicity. The ratio of tumor inhibition is 48.8%. On the other hand, GPM I<sup>H</sup> increased the weight of spleen of mice with S<sub>180</sub> cells at the dose of  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  per day  $\times 10$ .

**KEY WORD** Glycoprotein, *Mensamaria intercedens*, Chemical property, Antitumor activity

生物体内, 有生物活性的聚糖是很少单独存在的, 多数是与另一种或几种的糖缀合物 (glycoconjugate), 如糖蛋白 (glycoprotein)、糖脂和蛋白聚糖 (proteoglycan) 结合在一起的。已

经证实: 糖缀合物中的糖链作为信息分子涉及到多细胞生物生命的全部空间和时间过程。糖缀合物在血液与淋巴细胞循环中也起着动态的更为灵敏的信号识别和精密的调控作用, 特别

\* <sup>△</sup> 福建省重中之重大项目资助

\* 汕头大学理学院生物学系, 汕头 515063

\*\* 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005

是在免疫系统中,随着糖生物学的兴起和发展,糖蛋白、蛋白聚糖的许多重要生物活性也不断被揭示,其中颇引起医药界关注的是其抗癌活性<sup>[1,2]</sup>。二色桌片参是盛产于福建闽南沿海的一种低值海参,因其富含糖蛋白或蛋白聚糖,故将其分离提纯,并考察其抗肿瘤活性的特征。

1 材料与方法

1.1 材料

二色桌片参〔*Mensamaria intercedens* (Lampert)〕鲜品购自福建诏安市场。经种属鉴定,包括外部形态和体壁内骨片,特别是桌形体的鉴定<sup>[4]</sup>。

Sephadex G-200 Sigma 产品, fucoidin Sigma产品。

实验小鼠: BALB/c 小鼠(清洁级),体重 18~ 22g,雌雄兼用,肿瘤瘤株: S<sub>80</sub>腹水瘤细胞二者均由厦门大学抗癌研究中心实验动物室提供。

1.2 方法

1.2.1 海参糖蛋白的分离、纯化 取鲜二色桌片参,除去内脏,洗净,绞成糜状,加 10~ 20倍量的水,煮 2h,冷后滤除渣,放冷过夜,次日再滤除沉淀物,清液在 60℃以下薄膜浓缩至 1/4 体积,冷却后加入 2倍体积的 95%乙醇,置冰箱过夜。次日收集沉淀物,用乙醇和丙酮各洗涤 2次,减压抽干,得灰白色粗提物。粗提物重溶于适量的水,透析除盐后通过 Sephadex G-200 柱层析纯化,糖高峰部分收集合并,在 50℃薄膜浓缩至 1/2体积,加入 2倍体积的 95%乙醇,置冰箱过夜。次日收集沉淀物,洗涤,抽干,得白色粉末,定名为二色桌片参糖蛋白 I〔glyco-protein of *Mensamaria intercedens* I,简称 GPM I-I〕将 GPM I-I溶于适量的水,37℃水浴进行混合酶解 10h,酶解后,加热至 85℃除去蛋白,离心,清液醇沉淀,洗涤,减压抽干,得白色粉末,即二色桌片参糖蛋白 II(GPM I-II)。

1.2.2 GM PI-I和 GM PI-II的化学分析 红外吸收光谱(KBr压片),氨基酸组成定性定量分析等均委托厦门市药检所和有关测试中心按常规进行。

组成单糖分析采用进口预铺的硅胶薄层法(Kieselgel 60 F254, Merck 产品),使用 5种展开

剂,以苯胺-二苯胺-磷酸试剂显色。L-岩藻糖和 L-岩藻糖-4硫酸酯取 fucoidin (Sigma 产品)的硫酸水解物作参考标准。

1.2.3 GPM I-I和 GPM I-II抗肿瘤活性测定

BALB/c清洁级小鼠 90只,体重 18~ 22g,雌雄兼用,抽取 S<sub>80</sub>腹水瘤小鼠的腹水,用无菌的生理盐水稀释至每毫升  $\times 10^6$  个细胞,在小鼠右腋皮下接种制备模型(每只 0.2mL)<sup>[5]</sup>。小鼠随机分为 9组,每组 10只,每种糖蛋白分别设计 3个剂量组,每个剂量设计是根据文献<sup>[1]</sup>的剂量作参考的。此外还设计了阳性对照组(环磷酰胺, Cy)和阴性对照组(生物盐水)。小鼠每天注射给药 1次,连续 10d,停药 24h后将小鼠称重,脱颈椎处死,解剖剥离瘤块,称瘤重,计算抑瘤率。同时取其肝脏,脾脏,称重,观察肝脏脾脏重量的变化,对实验数据进行统计学分析(*t*检验)<sup>[5]</sup>。

2 结果

2.1 GPM I-I和 GPM I-II的主要理化性质与组成

GPM I-I和 GPM I-II都是白色无定形粉末,无味,不溶于常见的有机溶媒,可溶于水。糖类和蛋白的显色反应阳性。GPM I-I和 GPM I-II的总糖和总蛋白量如表 1,由表 1可见两者的总糖和总蛋白含量有着较明显的差异,由于 GPM I-II是将 GPM I-I的一部分蛋白用酶解法除去,所以其总蛋白含量明显减少,相应地总糖含量有了显著地增加。

表 1 GPM I-I和 GPM I-II的总糖和总蛋白含量

样品	总糖 (mg° g <sup>-1</sup> )	总蛋白 (mg° g <sup>-1</sup> )
GPM I-I	390	550
GPM I-II	680	230

GPM I-I和 GPM I-II分子中蛋白质肽的氨基酸组成分析结果如表 2。表 2表明它们分子中肽都是由常见氨基酸组成。GPM I-II的绝大多数氨基酸含量都比 GPM I-I有所降低。氨基酸总含量 GPM I-I接近 30%, GPM I-II接近 20% (酪氨酸、蛋氨酸、色氨酸等未测),这与两者总蛋白的含量变化是相符的。

表 2 GPM I-I和 GPMI-II的氨基酸组成及含量( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

氨基酸	GPM I-I	GPMI-II	氨基酸	GPM I-I	GPMI-II
门冬氨酸	39.5	30.6	异亮氨酸	10.0	4.5
苏氨酸	20.0	18.4	亮氨酸	16.8	10.5
丝氨酸	12.6	12.1	苯丙氨酸	6.2	3.2
谷氨酸	48.7	32.2	赖氨酸	10.0	5.5
甘氨酸	41.7	34.0	精氨酸	8.0	3.4
丙氨酸	10.5	8.6	脯氨酸	21.5	12.5
胱氨酸	3.0	1.9	组氨酸	9.5	0.4
缬氨酸	20.5	17.2			

组成单糖的分析显示两者都主要地由 L-岩藻糖和 L-岩藻糖硫酸酯组成的,这与我们曾从二色桌片参里分离到岩藻糖有某种生源学上的相关性<sup>[3]</sup>。

GMI-I和 GMI-II的红外吸收光谱如图 1,由图 1可见两者均有多糖羟基、酰氨基及吡喃糖环醚键的特征吸收峰,且两者之间差异很少。



图 1 GPM I-I和 GPMI-II的红外吸收光谱图

2.2 GPMI-I和 GPMI-II的抑制肿瘤作用  
抗肿瘤实验的初步结果表明,给药剂量在  $30 \sim 120 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, GPMI-I对小鼠  $S_{180}$  肿瘤均无明显的抑制作用 ( $P > 0.05$ ),而给药剂量在  $10 \sim 40 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, GPMI-I对小鼠  $S_{180}$  肿瘤却都有较显著的抑制作用,其中  $20 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的抑瘤效果最好,抑瘤率达到  $48.8\%$  ( $P < 0.05$ )。另外, GPM I-I在剂量  $30 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时可明显增加荷瘤小鼠脾脏的重量 ( $P$

$< 0.05$ ),而对小鼠肝脏重量无显著影响 ( $P > 0.05$ )。GPM I-II在剂量  $40 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时可明显减少荷瘤小鼠肝脏的重量 ( $P < 0.05$ ),对荷瘤小鼠脾脏的重量无显著影响 ( $P > 0.05$ )。详细的实验设计和结果,将另文报道。

### 3 讨论

本研究旨在探讨糖蛋白的分离、性质及其抗肿瘤活性。二色桌片参糖蛋白 (GPM I-I)可能是一种由蛋白或糖蛋白与岩藻聚糖结合在一起的生物大分子物质,具有明显的生物活性。经酶水解后,虽然降解去部分蛋白,但所得的 GPM I-II仍然具备了糖蛋白的特征。有趣的是, GPM I-I对小鼠  $S_{180}$  肿瘤无明显的抑制作用 ( $P > 0.05$ ),而 GPMI-II对小鼠  $S_{180}$  肿瘤有较显著的抑制作用,其中  $20 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的抑瘤效果最好,抑瘤率达到  $48.8\%$  ( $P < 0.05$ )。另一方面, GPMI-I在剂量  $30 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时可明显增加荷瘤小鼠脾脏的重量 ( $P < 0.05$ ),而对小鼠肝脏重量无明显影响 ( $P > 0.05$ ),但 GPMI-II无此作用。这些结果似乎提示了: GPMI-I是一种有效的免疫增强剂,但抑制肿瘤的活性不够明显。当部分蛋白被降解后, GPM I-I的抑制肿瘤作用增强,但作为免疫增强剂的作用却有所降低。至于糖蛋白 GPM I-II的抑瘤作用与它对小鼠自身免疫系统的生物反应调节作用的关系,还有待进一步研究。

### 参考文献

- 顾谦群,方玉春,王长云,等. 扇贝糖蛋白的化学组成与抗肿瘤活性研究. 中国海洋药物, 1998, 17(3): 23
- Kamiya H. and Muramata K. Studies on bioactive marine metabolites VIII. Characterization of the antibacterial and antineoplastic glycoprotein in a sea hare, *Aplysia juliana*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1998, 54(5): 737
- 吴萍茹,方金瑞,黄维真,等. 二色桌片参的化学成分研究 II. 二色桌片参多糖-I,一种新的岩藻聚糖. 中国海洋药物, 2000, 19(2): 4
- 吴萍茹,方金瑞,陈正明,等. 二色桌片参的化学成分研究 I. 二色桌片参的化学成分分析. 中国海洋药物, 2000, 19(1): 17
- 徐淑云,卞如瀛. 药理实验方法学. 人民卫生出版社,北京, 1991